

BULLETIN
VAN HET
DELI PROEFSTATION
TE
MEDAN — SUMATRA.
No. 19

ANDREAEA DELIENSIS N. GEN. N. SP.,
DE GROOTE STAPELSCHIMMEL
VAN DE DELI TABAK

DOOR

DR. B. T. PALM EN DR. S. C. J. JOCHEMS

ANDREAEA DELIENSIS N. GEN. N. SP.,
A STACK FUNGUS OF DELI TOBACCO.

BOEKJAAR VERBODEN VERKOPEN VAN DE DELTASTATION
STATISTIEK VAN DE DELTASTATION

DEEL I. PLANTEN VAN DE DELTASTATION.

UITGEGEVEN TER GELEGENHEID
VAN HET VIJFENTWINTIGJARIG
PLANTERS-JUBILEUM V. D. HEER
GAJUS HENRICUS ANDREAE,
VOORZITTER VAN HET BESTUUR
VAN HET DELI PROEFSTATION.

ANDREAEA DELIENSIS N. GEN. N. SP., DE GROOTE STAPELSCHIMMEL VAN DE DELI-TABAK

DOOR

DR. B. T. PALM EN DR. S. C. J. JOCHEMS.

In het najaar van 1921 kwam op verscheidene ondernemingen in de fermenteerstapels een schimmel voor, die een vrij ernstig karakter dreigde aan te nemen. Een viertal ondernemingen riepen onze hulp daaromtrent in, terwijl op een groot aantal andere, waar wij in de gelegenheid waren de gefermenteerde tabak te zien, door ons de aanwezigheid van boven bedoelde schimmel geconstateerd kon worden. In 1922 werd op verschillende ondernemingen deze schimmel wederom in den fermenteerstijd gesignaleerd, doch in geen enkel geval in zoo groote hoeveelheid als in 1921.

Omtrent het optreden van deze schimmel in de jaren vóór 1921 hebben wij niets positiefs te weten kunnen komen, wel zou men haar hier en daar wel eens gezien hebben, doch aangezien nog enkele andere schimmels op de gefermenteerde tabak kunnen voorkomen, weten wij niet of het hier ging om de schimmel, die in het volgende beschreven wordt. Gaan wij verder de jaarlijsten der aan het D. P. S. toegezonden monsters na, dan vinden wij wel in sommige jaren vermeld, dat een enkele bundel tabak met schimmel werd ontvangen, doch of dit een gefermenteerde dan wel slechts een droge bundel betrof, hebben wij niet kunnen te weten komen, evenmin welk type van schimmel het betrof. Uit een en ander meenen wij echter te mogen besluiten, dat slechts zelden de bedoelde schimmel zoo sterk zal zijn opgetreden als in 1921.

Een en ander wordt ook verduidelijkt door het feit, dat wij in het voorjaar van 1922 door bemiddeling van een der vier groote maatschappijen een afschrift van een rapport ontvingen, hetwelk betrof „een onderzoek naar de levensvoorwaarden van een schimmel voorkomende op tabaksbladeren”. Dit rapport was uitgebracht door een bacteriologisch laboratorium in Holland, dat de desbetreffende tabaksbladeren van oogst 1921 ter onderzoek van makelaars had ontvangen

Hoewel dit rapport het idee geeft van de hand van een chemicus te zijn, meenen wij er toch uit te mogen opmaken, dat het over dezelfde schimmel loopt als die wij in 1921 overal aantreffen. In het volgende komen wij op deze quaestie nog terug.

HOOFDSTUK I.

Beschrijving van de schade.

De schimmel werd door ons waargenomen in alle tabakspartijen behalve in het zandblad. De eischen, die de schimmel aan den vochtigheidstoestand van de tabak stelt, zal daarvan wel de reden zijn. In hare meest typische gedaante komt de schimmel voor in uitgefermenteerde stapels, die niet hooger dan ongeveer 48° C. oploopen. Wordt zoo'n stapel afgebroken, dan begint men de schimmel eerst te zien als een laag van 1 á 2 voet dikte van de stapel is afgenomen; zij bevindt zich dan verspreid over het geheele oppervlak, uitgezonderd een rand ter breedte van ± 2 voet. Wordt met afbreken voortgegaan, dan ziet men het verspreidingsareaal der schimmel een bandvorm aannemen, die, hoe lager de stapel wordt, steeds wijder wordt, totdat tenslotte de schimmel beperkt is tot een strook van ± 1 voet breedte, die ± 2 voet van den rand van den stapel verwijderd is. Scherpe grenzen zijn echter niet te zien. Een en ander wijst er direct op, dat de schimmel bepaalde eischen stelt aan de uitwendige omstandigheden.

Is een tabaksbundel zwaar aangetast dan maakt het op het eerste gezicht sterk den indruk of de bundel met kalkspatten is bedekt zoowel op de nerven als op de tusschengelegene deelen. De schimmelplekken zijn meest rond met een middellijn van 1 à 10 m.m. en bestaan uit een vrij sterk wollig myceel, zuiver wit van kleur, waarin met een goede loupe (lineaire vergrooting ongeveer 30 x) de talrijke snoeren van conidiënsporten zijn te zien. De schimmelvlekken laten gemakkelijk van het tabaksblad los en een lichte wrijving tusschen vinger en duim is meestal reeds voldoende om de vlek te verwijderen. Wel dringt het myceel het tabaksblad binnen en groeit er soms bij de zeer groote vlekken dwars doorheen, doch zelden of nooit zal zelfs daar ter plaatse het blad onsterk worden. De schade bestaat dus hierin, dat het uiterlijk der tabak door de schimmel geschaad wordt.

HOOFDSTUK II.

Beschrijving van de schimmel.

Uit de tabaksliteratuur zijn een aantal gevallen bekend, waarbij in

fermenteerende of reeds gefermenteerde tabak schade door schimmels werd aangericht. In Italie treedt soms een ziekte „fioritura” geheeten, van sigaren en fermenteerende tabak op, die plaatselijk vrij veel schade zou aanrichten. Deze kwaal wordt veroorzaakt door een schimmelsoort, *Oospora Nicotianae* Splendore ¹⁾, die naar de beschrijving te oordeelen zekere punten van overeenkomst met de Delische stapelschimmel schijnt te hebben. Uit andere Europeesche tabaksdistricten worden schimmels van een *Oospora*-achtige type op geoogste tabak vermeld ²⁾.

Het leek ons daarom van belang de identiteit van de groote stapelschimmel vast te stellen; daardoor zou blijken, of dezelfde schimmel reeds uit andere tabaksstreken bekend was, wat met het oog op de te nemen bestrijdingsmaatregelen waardevol moest zijn.

In een volgend hoofdstuk worden onze isolatie- en kweekproeven uitvoerig beschreven. Van reincultures op de aldaar genoemde agar-voedingsbodems werd de beschrijving van de Delische groote stapelschimmel opgemaakt. Reeds hier willen wij vermelden, dat deze schimmel zonder eenigen twijfel tot een tot nu toe onbekend geslacht behoort, welk in de familie der *Aspergillaceae* moet worden ondergebracht. Wij hebben ons veroorloofd het nieuwe schimmelgeslacht naar den Heer G. H. Andreae, Voorzitter van het Bestuur van het Deli Proefstation en Hoofdadministrateur van de Deli Maatschappij, te noemen. In het vervolg zal dus van de groote stapelschimmel onder den naam van *Andreaea deliensis* Palm et Jochems n. gen. n. sp. gesproken worden.

Een zes dagen oude cultuur *Andreaea deliensis* is op den voedingsbodem reeds waar te nemen als een donzig plekje van witte myceeldraden. Naar gelang van den voedingsbodem gaat de witte kleur vroeger of later over in een meer geelachtig getinte, welke zienderoogen toeneemt naar mate vruchtlichamen ontstaan en in aantal toenemen. Voor de beschrijving van den groei der schimmel op de verschillende voedingsbodems wordt verwezen naar hoofdstuk III, waar verdere bijzonderheden worden medegedeeld.

Het myceel bestaat uit rijk vertakte doorschijnende hyphae, 2-3 mikrons in diameter; er is practisch gesproken geen verschil in diam.

¹⁾ Splendore, A. Sopra una nuova specie di „Oospora”, denominata „Oospora Nicotianae” quale causa della „Fioritura” nei sigari forti e nelle masse in fermentazione di questa soste di lavorati. Studio eseguito nel Laboratorio Chimico annesso al Riparto Sperimentale della manifattura dei tabacchi in Roma. — Revista tecnica e di Amministrazione per i servizi delle private. 1899.

²⁾ Behrens, J. Mykologie der Tabakfabrikation. Handbuch der Technischen Mykologie, herausgegeben v. F. Lafar. Bd. V. 1905.

Peters, L. u. Schwartz, M. Krankheiten und Beschädigungen des Tabaks. - Mitteil. a. d. Kaiserl. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft. 1912.

waar te nemen tusschen de myceeltakken van hoogere of lagere orde. De talrijke dwarswanden treden eenigszins onregelmatig op, waardoor de individueele cellen vrij groote verschillen in lengte vertoonen. De wijze van vertakking is in het jongere myceel soms min of meer rechthoekig, vooral in de peripherie van de kolonie, maar naar mate de ontwikkeling der draden weelderiger wordt, is van regelmaat geen sprake meer.

Op de kortere zijtakken worden de conidiën gevormd (fig. 1. pl. III). Daarbij kan er eigenlijk moeilijk van echte conidiën-dragers worden gesproken, daar de conidiën-vormende myceeltakken geen bepaalde differentiatie vertoonen. De manier, waarop de vorming der conidiën plaats vindt, komt nauw overeen met die van het geslacht *Oospora* Wallr. Met het oog op de beneden beschreven sclerotiën-vorming van *Andreaea deliensis*, waardoor de systematische positie van de schimmel in een interessant licht komt, dient dit speciaal te worden vermeld. De conidiën-dragers schijnen altijd heel kort te blijven, vergeleken ten minste bij het zuiver vegetatieve myceel.

De conidiën worden in lange parelsnoerachtige ketenen gevormd, doch die spoedig in de individueele conidiën uitelkaar vallen. Zij zijn min of meer langwerpig van vorm, wat eerst duidelijk zichtbaar wordt, nadat zij geïsoleerd zijn; hunne afmetingen blijven om ± 3 mikr. schommelen. Een of andere structuur schijnen zij verder niet te bezitten.

Reeds na betrekkelijk korten tijd gaat de schimmel op een voedingsbodem over tot het vormen van de typische steriele vruchtlichamen of sclerotiën. Het optreden der sclerotiën maakt zich eerst door een beginnende geelbruine tint van de schimmel-kolonie merkbaar. De kolonie krijgt langzamerhand een gele korrelige oppervlakte, die met toenemende ouderdom van de sclerotiën donkerbruin wordt (zie plaat II). Bij onderzoek onder een loupe, bij beginnende vorming van sclerotiën, kan niet zelden een duidelijke zónale verdeling van deze lichaampjes worden waargenomen, zooals fig. 2 pl. III weergeeft. Door het optreden later van talloze nieuwe vruchtlichamen over de geheele oppervlakte van het myceel wordt de oorspronkelijke regelmatige verdeling ervan verstoord.

De volwassen vruchtlichamen, die een diameter van $\pm 0,4$ m.m. kunnen bereiken, hebben een eenigszins ruwe bruine korst; zij zijn zeer hard. Ondanks talrijke pogingen om de sclerotia tot het vormen van asci en ascosporen te brengen, door het varieeren zoowel van de samenstelling van de voedingsbodems als van de uitwendige groei-voorwaarden, is dit helaas tot nu toe niet gelukt. *Andreaea deliensis* gedraagt zich blijkbaar in dit opzicht als eenige *Aspergillus*- en *Penicillium*-soorten. Veel overeenkomst vertoont de fijnere bouw der sclerotiën van de groote stapelschimmel met die van b. v. *Penicillium italicum*

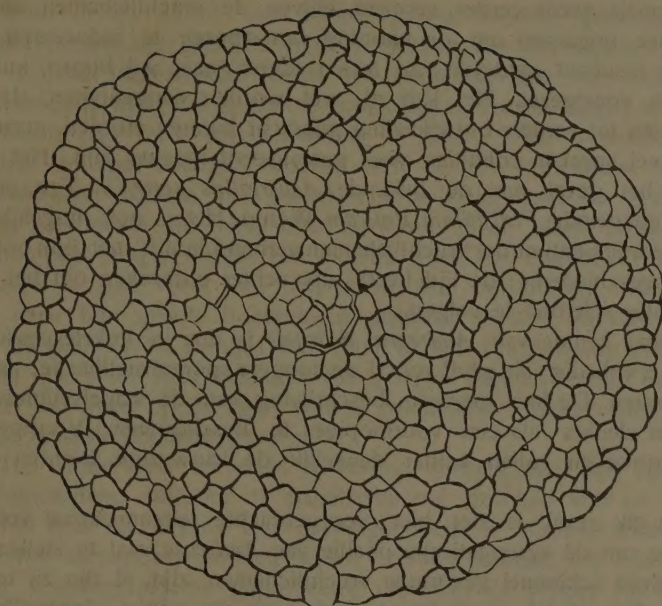


Fig. 1. *Mediane dwarsdoorsnede van een sclerotium van Andreaea deliensis. Vergr. ongeveer 300 X.*

Wehm. Zij zijn dus van buiten, zooals gezegd, slechts wat ruw van oppervlakte, maar bezitten verder geen aanhangsels of gedifferentieerde periferische hyphen. Wel kunnen zij soms overgroeid zijn door min of meer talrijke myceeldraden, waardoor het aanschijn wordt verwekt, dat de oppervlakte van uitgroeisels voorzien is; deze hyphen onderscheiden zich echter in niets van het gewone steriele myceel.

Het microscopische beeld van den inwendigen bouw der sclerotien is ook geheel hetzelfde als dat van de steriele vruchtlichamen van de zooeven genoemde *Penicillium*-soort. De opperhuid bestaat dus ook bij *A. deliensis* uit een laagje, naar buiten toe, zeer dikwandige cellen, die op een mediane doorsnede veel gelijkenis vertoonen met de epidermis-cellen van hogere planten (zie tekstfig. 1). Overigens wordt het sclerotium opgebouwd door pseudoparenchymatische cellen, ook met dikke wanden, die echter naar het centrum toe dunner worden.

Deze dikwandige cellen staan onderling met elkaar in verband door zeer nauwe kanalen, die ten eerste op de plasmodesmen tusschen de cellen der hogere planten lijken. Dit punt maakt de overeenstemming met de vruchtlichamen van eenige typische *Aspergillaceën* compleet.

Zooals reeds eerder vermeld, blijven de vruchtlichamen steriel; alle onze pogingen om de vorming van sporen te induceeren zijn zonder resultaat gebleven; ze zullen echter, naar wij hopen, kunnen worden voortgezet. Het kan nl. wel worden aangenomen, dat de sclerotiën tot verdere ontwikkeling gebracht kunnen worden, maar dat daar heel speciale condities voor gerealiseerd moeten zijn. Het zelfde is het geval met de bekende *Aspergillus niger* v. Tgh. en de reeds genoemde *Penicillium italicum* Wehm. Het is ook mogelijk, dat de sclerotiën-natuur der vruchtlichamen verband houdt met hun ontwikkelingsgeschiedenis; de tijd heeft ons echter ontbroken om het ontstaan der sclerotia te volgen.

Onze kennis van *Andreaea deliensis* is dus in enkele opzichten nog niet volledig; dit geldt vooral de hoogere sporenfructificatie: asci en ascosporen. De hier gegeven beschrijving van de stapelschimmel is daarom slechts als een voorloopige te beschouwen. Voortgezette cultuurproeven zullen echter denkelijk de aanwezige leemten doen vullen.

In elk geval is het hier voorgebrachte feitenmateriaal volledig genoeg om de systematische positie van *Andreaea* vast te stellen. De door deze schimmel gevormde vruchtlichamen zijn, al zijn zij tot nu toe slechts steriel gevonden, typisch voor een aantal *Aspergillaceën*. *Andreaea* moet dus in deze familie worden ondergebracht. Zoover wij uit de ons ter beschikking staande literatuur kunnen oordeelen, zijn verder de tot nu beschreven geslachten gekenmerkt door een van onze schimmel afwijkende conidiën-vorming, want alle hebben óf meer gedifferentieerde conidiën-dragers óf een andere wijze van conidiën-vorming. Dat de conidiën-fructificatie van *Andreaea deliensis* tot het geslacht *Oospora* Wallr. schijnt te behooren, beteekent in dit verband alleen, dat in het conglomeraat van conidiën-stadia van hoogere schimmels, welke om praktische reden onder deze geslachtsnaam worden samengevat, zich ook soorten bevinden, die bij de *Aspergillaceën* thuis hooren.

Voor de diagnose van *Andreaea deliensis* wordt verwezen naar de Engelsche samenvatting (blz. 18).

HOOFDSTUK III.

Kweek- en Infectie-proeven met *Andreaea deliensis*.

De isoleering van de saprophyt leverde niet de minste moeilijkheden, zoowel door het vlugge groeien van het schimmelmyceel op een geschikte voedingsbodem, als door het feit, dat de geheele bacteriën- en fungiflora der fermenteerstapels niet groot is. Stukjes myceel werden

met een steriel pincet van enkele groote vlekken genomen, op bouillon-pepton-agar gebracht en ter verdeling van de conidiën-sporen over de plaat uitgestreken. Reeds den volgenden dag was onder het microscoop kieming der sporen te constateeren. Na zes dagen was met het bloote oog reeds mycelvorming te zien, zoodat overgeënt kon worden op agar-hellingen, waarop zich nu een reïncultuur van de schimmel ontwikkelde, die geheel met de oorspronkelijke schimmel op de gefermenteerde tabak overeenkwam; alleen bleek zich op de bouillon-pepton-agar weldra een tweede wijze van fructificatie te ontwikkelen in den vorm van sclerotiën. Met het bloote oog waren deze door hun groote hoeveelheid duidelijk te zien, zij vertoonden zich als kleine witte puntjes het eerst in het centrum van een vlek, daarna ook in de naar den rand toe gelegen deelen. Zoodra met het bloote oog groei op de agar was te constateeren hadden zich reeds groote massa's conidiën gevormd.

Ten einde meer te weten te komen omtrent den aard van den voedingsbodem, die voor de stapelschimmel geschikt was en vooral met het doel zoo tevens een voedingsbodem te vinden, waarop de sclerotiën ascosporen zouden willen vormen, hebben wij een groot aantal voedingsbodems geprobeerd, die meer of minder rijk waren aan voedende bestanddeelen.

Gefermenteerde tabak.

Gebruikt werden: Deli-tabak (zandblad, dun voetblad, dik topblad), Havana (zeer dik zwart blad) en Seedleaf (zeer dik, lichtbruin blad). Op elkaar gelegde stukken met water bevochtigd blad ter grootte van 50 c.m². werden in platte glazen kolven gebracht en op drie achtereenvolgende dagen in den dampcylinder gesteriliseerd.

Na geënt te zijn met conidiën-sporen van een bouillon-pepton-cultuur was op alle tabakssoorten binnen een week met het bloote oog overvloedige groei te constateeren, het eerst en het weligst op de dikkere, „vette” tabakssoorten. Gekweekt werd bij kamertemperatuur, gemiddeld 28° C. Conidiën-sporen ontstonden bij alle, sclerotiën bij geen enkele gefermenteerde tabakssoort, precies als dus in de practijk in de Deli-stapels was te constateeren. Bij het kweken bij hoogere temperaturen om de maximum-temperatuur te vinden, kon nagenoeg geen verschil in groei geconstateerd worden met die bij kamertemperatuur. In het algemeen was de groei iets vlugger en weliger bij temperaturen om en bij 34° C. De schimmelplekken bleven op gefermenteerde tabak helder wit en wollig, zelfs al werden de bladeren jaren lang bewaard.

Droge tabak.

Hiertoe werd gebruikt tabak, die volledig gedroogd was, doch nog niet gefermenteerd. In het algemeen was de groei als bij gefermenteerde tabak; alleen werd gekweekt bij kamertemperatuur.

Groene en houtige plantendeelen.

Reepjes groen tabaksblad, stukjes groene tabaksstengel en stukjes afgestorven mimosastengel werden in reageerbuisjes gefractioneerd gesteriliseerd. Op alle trad groei op, hoewel met veel variatie. Het krachtigst ontwikkelde de schimmel zich op de groene tabaksstengels, vooral op het merg. Op alle genoemde plantendeelen werden sclerotiën gevonden, het minst op de mimosastengels, het talrijkst, zelfs even talrijk als op de bouillon-pepton-agar, op het merg van de tabaksstengels. Alle cultures waren bij kamertemperatuur. Hoe ouder de cultures werden des te meer trad bruinkleurig op, klaarblijkelijk te danken aan de verkleuring der sclerotiën.

Aardappelstaafjes.

Reeds na 4 á 5 dagen begon bij kamertemperatuur groei met het bloote oog zichtbaar te worden. Na enkele dagen was het geheele oppervlak der aardappelstaafjes met dicht wollig myceel overdekt, dat in tegenstelling met op de andere genoemde en nog te noemen voedingsbodems zich ver buiten de entstreepen uitstreckte. De aardappelstaafjes gingen geheel krom staan en het schimmeloppervlak werd zwaar gerimpeld. Een buitengewoon groote hoeveelheid sclerotiën ontwikkelde zich, terwijl ondiep in de aardappel zich een geheele korst van sclerotiën vormde. Door de steeds er nieuw bij komende werden de oude blijkbaar opgedrongen, raakten los en vielen bij zacht tikken tegen de buisjes in heele vlokken naar beneden. Terwijl de cultures op aardappel in de eerste dagen helder wit waren, begon na ongeveer 3 weken een grauwbrown verkleuren op te treden. Na ruim een maand was het geheele schimmel-oppervlak grauw geworden, terwijl de los erop liggende sclerotiën een bruinere tint hadden. De aardappelen zelf waren grauw verkleurd. Het beschreven verschijnsel op aardappelstaafjes is uiterst typisch voor de stapelschimmel en wijkt zeer sterk af van de cultures op de andere voedingsbodems.

Maïsagar.

Na 5 dagen was met het bloote oog reeds groei te constateeren; na 6 dagen begon een rijke sclerotiën-vorming en het geheel was helder wit van kleur. Na 20 dagen werden de sclerotiën zuiver

citroengeel. Deze kleur bleef bestaan tot na ongeveer 2 maanden; toen ging deze over in een meer vuilbruine tint. De agar zelf was toen echter nog even wit als bij het begin. Eerst na 3 maanden werd ook de agar iets grauw. De beschreven cultuur op maïsagar heeft betrekking op die bij 28° C. Bij hogere temperaturen gekweekt gedroeg de kleursverandering zich anders. In verband met het bepalen van de optimum- en maximum-temperaturen en ook met het oog op een mogelijke ascosporenvorming werden speciaal de cultures bij 34° en 39° nauwkeurig nagegaan. Bij 34° gedroeg de cultuur op maïsagar zich in zooverre anders, dat de geheele groei vlugger was met een nog rijker sclerotiënvorming. Reeds na 2 dagen was groei te constateeren; na 6 dagen ontwikkelden de sclerotiën zich uiterst talrijk. Na 10 dagen reeds werden zij helder citroengeel en hadden zij zich opgehoopt tot bolvormige massa's van 1/2 à 1 m. m. middellijn. De intensiteit der gele kleur nam tot 20 dagen nog toe. Na 1 maand begon de grauwe verkleuring. Evenzoo werd de agar zelf toen donkerder. Na 3 maanden was de geheele gele tint in een bruingrauwe overgegaan en was de agar zelf donkergrijs op zwart af. In vele opzichten komt de cultuur op maïsagar bij 34° met die bij 28° overeen, alleen is de groei vlugger en weliger. Iets geheel anders werd dit bij 39°, welke temperatuur, zooals wij hierna zullen zien, dicht bij de maximum temperatuur ligt. De groei was bij 39° over het algemeen een paar dagen ten achter bij die van 28°; de myceelvorming was zeer rijk, de sclerotiënvorming bleef achterwege. Van een gele kleur was niet de minste spoor te zien, alles bleef helder wit. Conidiën-sporen werden wel gevormd, doch belangrijk minder dan bij lagere temperaturen. De witte tint bleef steeds aanwezig.

Bouillon-pepton-agar.

Deze voedingsbodem was samengesteld uit 1 % bouillon (Liebig) en 1 % pepton. Bij 28° gekweekt was na 5 à 6 dagen groei bemerkbaar. Sclerotiën ontwikkelden zich in groote hoeveelheid en lagen verspreid over de agar hoewel iets minder dan op maïsagar. De kleur was in het begin zuiver wit, na 3 weken werd zij grauwbruin, welke kleur geleidelijk donkerder werd, tot na 3 maanden stilstand in de verkleuring optrad. De agar zelf was toen iets donkerder bruin geworden. Bij 34° gekweekt was de groei in het algemeen een paar dagen bij de cultures bij 28° vooruit, er ontwikkelden zich meer sclerotiën en de grauwe verkleuring trad eerder op.

Saccharose-agar.

Speciaal met het doel om ascosporenvorming te krijgen werden

cultures aangelegd op saccharose-agar van verschillend saccharosegehalte, n.l. van 5, 10, 20, 40 en 60 %, allen zoowel bij 28° als bij 34°. Steeds trad groei op, zelfs op agar met 60 % saccharose; de lagere concentraties waren echter voor de schimmel beter geschikt. Na 4 à 5 dagen trad bij allen reeds groei op en werden sclerotiën gevormd, doch na 10 dagen gingen de cultures op de agar met 60 tot 20 % saccharose niets meer vooruit en was het totaal aantal sclerotiën gering; conidiën-sporen ontstonden in groote hoeveelheid. Op saccharose van 10 en 5 % was dit alles beter, doch een weelderige ontwikkeling zooals op de voorgaande voedingsbodems werd beschreven, had nooit plaats. In het algemeen was bij 34° de groei vlugger en iets rijker dan bij 28°. Een geringe grauwe verkleuring begon na 1 maand op te treden; de agar begon eerst na 3 maanden iets te veranderen, werd n.l. lichtgeel, doch slechts heel weinig.

Uit het voorgaande mogen wij besluiten dat de stapelschimmel zeer weinig kieskeurig is in zijn substraat en dat, zooal niet sclerotiënvorming plaats vindt, de snelle en overvloedige vorming van conidiën-sporen de aanname van een algemeen voorkomen wettigt. Steeds wanneer temperatuur en vooral vochtigheidstoestand gunstig zullen zijn, zal de schimmel zich kunnen ontwikkelen.

HOOFDSTUK IV.

Invloed van temperatuur en vochtigheid.

Wanneer de stapelschimmel van de te verscheppen tabak is verwijderd, is het zeer goed mogelijk, dat, door het zonder twijfel achterblijven van vele conidiën-sporen, de schimmel zich op nieuw zal vormen. Mocht de tabak al in een uitstekende vochtigheidstoestand verder behandeld zijn, dan zou om de een of andere reden tijdens de verzending of de bewaring in Europa de vochtigheidstoestand zoo zeer kunnen toenemen, dat de schimmel zich wederom vertoont. Nagegaan hebben wij daarom of de temperatuur hierbij ook een belangrijke rol speelt. Welke zijn de minimum- maximum- en optimum-temperaturen? Gebruikt werden ter bepaling hiervan gefermenteerde tabak, bouillon-pepton-agar en soms maïsagar als voedingsbodems. Het resultaat was, dat als maximum-temperatuur 40° à 41° moet worden aangenomen. Bij temperaturen hierboven kiemden de conidiën-sporen niet meer; zij bleven echter in leven en werden zij vervolgens op een temperatuur beneden 40° gebracht, dan trad na eenige dagen wederom kieming op. Doodelijk voor de conidiën-sporen bleken temperaturen van 48° en zelfs nog lager, als de expositietijd slechts lang genoeg was.

Een temperatuur van 45° gaf b. v. het volgende :

expositie-tijd	resultaat
24 uur	na 5 dagen vrij sterke groei
3 x 24 "	" 5 " zwakke "
4 x 24 "	" 7 " een enkele kolonie
5 x 24 "	geen groei

In het algemeen kunnen wij dus zeggen, dat temperaturen boven 50° C. doodelijk voor de schimmel en zijn sporen zullen zijn.

De Hr. P. de Haan van het Pathologisch Laboratorium te Medan had de welwillendheid voor ons de minimum-temperatuur te bepalen. De ijskisten, waarin deze bepalingen geschieden hadden een temperatuur, die een paar graden varieerden door het dagelijks bijvullen.

temperatuur	resultaat
12 — 14°	geen groei
18 — 20°	zeer zwakke groei na 17 dagen
20 — 22°	" " " " 8 "
24 — 25°	welige groei na 7 dagen

Gevoegelijk kunnen wij dus 18 à 20° als de minimum-temperatuur aannemen. In Holland zal de schimmel dus geen kans hebben zich te ontwikkelen.

De optimum-temperatuur ligt om en bij 33°.

Zooals bij de meeste schimmels, is de vochtigheidsgraad de voornaamste factor, die over de uitbreiding en groei van de stapelschimmel beslist. Steeds waren de bundels, waarop schimmel in de fermenteerstapels door ons werd waargenomen, werkelijk vochtig te noemen en meer of minder „druk”, wat aan deze hooge vochtigheidsgraad moet worden toegeschreven, kwam ook steeds voor. De bladeren plakten op elkaar. Naar onze meening is dit de reden, dat op zandblad de schimmel niet werd waargenomen; zandblad is steeds van drogere gesteldheid dan de hooger aan de tabaksplant zittende bladeren. De hooge vochtigheidsgraad, dien de schimmel eischt, verklaart tevens het slechts in een bepaalde zône van de stapels voorkomen: de bundels langs de rand van de stapel gelegen zijn te droog. Dat de schimmel ook niet in het hart van de stapel voorkomt, vindt zijn reden in een te hooge temperatuur. Zelfs bij de z. g. uitgefermenteerde stapels bedraagt de temperatuur in het hart toch altijd nog ongeveer 48°, welke, zooals wij gezien hebben, ver boven de maximum-temperatuur ligt. Misschien dat hierbij ook het gehalte aan CO₂, mogelijkerwijs nog andere stoffen, bij deze quaestie een rol speelt; hieromtrent hebben wij echter geen proeven genomen.

Wij hebben de schimmel geënt op luchtdroge tabak, d.w.z. op

tabak, welke dagen lang open aan de atmosfeer in het laboratorium was blootgesteld (relat. vochtig. varieert tusschen 60 en 85), op mooie soepele, pas uit een stapel komende tabak en op tabak, die van te voren kletsnat gemaakt was, doch waarbij vrij water zich niet meer op de bladeren bevond. Alleen op de laatste was na 5 dagen groei te constateeren. Op de andere waren de sporen niet in staat te kiemen.

Wij willen hier thans onze groeivoorwaarden vergelijken met die, welke in Holland gevonden zijn en welke vermeld zijn in genoemd verslag. Wij lezen dan:

„ gebracht op steriele schijfjes aardappel, die verder vijf dagen in den thermostaat bebroed werden, waarbij zich de schimmel krachtig tot een wit dons ontwikkelde”.

„Het bleek dat, wanneer de schimmel uitgezaaid werd op tabaksbladeren, die vochtig waren gemaakt met steriel water, na zelf gesteriliseerd te zijn, er bij gewone temperatuur, pl. m. 15° C, geen groei was waar te nemen”.

„ bij temperaturen van pl. m. 25° een sterke groei optrad”.

„Wanneer deze zelfde proef herhaald werd met droge bladeren (onder droog wordt hier luchtdroog verstaan), dan trad zoowel bij 15° als bij 25° geen groei op”.

„Bij allen 1) werd een duidelijke groei waargenomen, zoodat hieruit volgt, dat de soort blad van geen invloed op de ontwikkeling van de schimmel is”.

„ had de verhitting gedurende 24 uur op 50° plaats en werd de proef bij 25° voortgezet, zoo was na 8 dagen een begin van groei waar te nemen, die veel minder was dan in het vorige geval. 2) De schimmel had dus wel geleden, was echter nog in staat zich te ontwikkelen”.

Een en ander wijst er o. i. sterk op, dat deze in Holland onderzochte schimmel dezelfde is als in Deli zelf is waargenomen; een bewijs is het echter niet. Wat over morphologische eigenschappen in bedoeld verslag voorkomt, is zeer onvolledig.

HOOFDSTUK V.

Bestrijding.

Uit het voorgaande blijkt welke maatregelen genomen dienen te

1) Bedoeld is voetblad, middenblad en topblad.

2) Bedoeld is verwarming tot 40°C gedurende 24 uur.

worden om stapelschimmel te voorkomen of, zoo zij eenmaal aanwezig is, om te verwijderen; zij zijn voornamelijk gebaseerd op een voldoende droge behandeling. In het algemeen zal men moeten beginnen met de gedroogde tabak niet te vochtig op stapel te zetten; ook om andere technische redenen is dit af te keuren. Het bindmiddel voor het maken der bundels, wat in Deli vrijwel uitsluitend „koelit kajoe” is, mag om de soepelheid te bevorderen niet te nat gebruikt worden; het mag alleen vochtig genoeg gemaakt worden om zijn stevigte te behouden. Hooger fermenteren, dan tot nog toe gebruikelijk is (het laagste is wel 50 à 52° C), is onnoodig; deze temperaturen zijn altijd nog hoog genoeg om de schimmel en haar sporen te doden. Tegen dat de tabak uitgefermenteerd raakt, zal de infectie van buiten af plaats vinden. De tabak, die afgepakt wordt ter verzending, zal beslist luchtdroog moeten zijn en blijven; is de tabak tot het afpakken vrij van schimmel gebleven, dan zal bij het doorvoeren van genoemde maatregel ook geen schimmel tijdens de verzending meer optreden.

Komt er eenmaal schimmel in een stapel voor, dan dient men de vochtigheidsgraad van de desbetreffende tabak naar beneden te brengen door luchtig in manden op te stapelen of overdag uit te hangen. Een zeer goede maatregel is ook de tabak op ovale ringvormige stapels te zetten, welke dus binnenin hol zijn en waarvan de ring een dikte van ongeveer 3 voet heeft. Van zelf zal de tabak dan voldoende droog worden. Tevens is het wenschelijk zoo vlug mogelijk met sorteeren te beginnen; de tabak wordt dan nog aanmerkelijk droger en de sortatie is tevens de beste gelegenheid om de schimmelplekken te verwijderen. Tabak, waarop de schimmel eenmaal is voorgekomen, zal met de meeste zorg moeten worden afgepakt, opdat de in groote hoeveelheid achtergebleven sporen niet opnieuw schimmelplekken zullen veroorzaken.

SUMMARY.

Recently (in 1921 and 22) a fungus has caused some damage, in the tobacco growing district on the East Coast of Sumatra to tobacco in fermenting stacks as well as to tobacco exported to Europe. The fungus in question causes whitish to grayish mouldy spots on the leaves (pl. I), apparently of a similar nature as e. g. the s. c. „fioritura” on Italian tobacco as described by Splendore¹⁾, and on other kinds of European tobacco by Behrens and others¹⁾. The leaves attacked by the fungus are not supposed to deteriorate in strength generally, but a decrease in value of the leaf for wrapper purposes results.

The fungus has been isolated and cultivated in pure culture on various media. The following preliminary description of the fungus is based mainly on material from these cultures.

The mycelium is somewhat irregularly septated, profusely branched, the newly developed branches in younger colonies growing at about right angles to the main ones. The oblong conidia, measuring ± 3 micron in length, are formed from shorter mycelial parts, not differentiated into conidiophores.

On artificial culture media — not, however, on fermenting or cured tobacco leaves in stack or packages under estate conditions, not even after artificial inoculation under laboratory conditions — sclerotia are formed, and generally in big numbers. The colour is white at first, later changing from yellow to dark brown (pl. II); the surface is smooth to somewhat rugged in places — thus without any peripheral outgrowths. They attain a diam. up to 0,4 mm. Till now these sclerotia have remained sterile, it having been impossible to induce formation of asci and ascospores by changing environmental conditions.

Further cultural work is planned.

From an anatomical point of view the sclerotia show a close resemblance to those of some *Aspergillaceae*, a.o. *Penicillium italicum* Wehm. (comp. fig. 1, p. 9).

The sclerotia agree so closely with the *Penicillium* type of perithecia that, notwithstanding the absence of asci and ascospores, the

¹⁾ See foot notes on p. 7 of Dutch text.

stack fungus must be regarded as belonging to the *Aspergillaceae*. Because of its undifferentiated *Oospora* like „conidiophores” and conidia which — as far as we have been able to find in the mycological literature to our disposal — is not met with in any of the existing genera, a new genus for the fungus in question must be created. The new genus has been named *Andreaea*, in honour of Mr. G. H. Andreae, President of the Board of Directors of the Deli Experimental Station.

We let the preliminary diagnosis of *Andreaea deliensis* follow.

ANDREAEA nov. gen. — Mycelium septate, hyaline; conidia formed from short, undifferentiated „conidiophores” of an *Oospora* like type; perithecia small, coloured, practically smooth, hard, composed of thick-walled pseudoparenchymatous cells (*Penicillium* type). Asci and ascospores unknown.

A. deliensis n. sp. — Mycelium at first white, later grayish white; conidia numerous, hyaline, oblong, \pm 3 micron long; perithecia sterile (sclerotia), up to 0,4 mm. in diam.; when young white, later yellow to dark brown. — Saprophyte on fermenting and cured tobacco in Deli, East Coast of Sumatra.

The following data regarding *Andreaea deliensis* in culture have been collected.

Inoculations on cured tobacco leaves (Deli, Havanna, Seedleaf) at room temperatures (\pm 28° C) show pure white mycelial growth with abundant formation of conidia; no sclerotia, however.

On green leaves and stems of tobacco, dead stems of Mimosa invisa, at 28° C, conidia and sclerotia are formed; colonies macroscopically at first whitish, later brown, the colour being caused (apparently) by the sclerotia.

On potato plugs at 28° C an abundant development of white, later grayish, mycelium is seen; sclerotia formation exceptionally rich.

On corn meal agar at 28° C rapidly growing white colonies form that later turn gray; conidia and sclerotia are abundant; the latter change from pure lemon yellow to dark brown after 2 months. At 39° C only conidia develop.

On bouillon pepton agar at 28° C and 39° C conidia as well as sclerotia are formed.

On different concentrations of saccharose (5 — 60 %) agar some growth is always made, but less luxuriantly than on the above mentioned media; this applies especially to the concentrations between 20 and 60%. Conidia and sclerotia are always found; the latter, however, are scarce.

Regarding the temperature relations of the fungus the following values have been determined: minimum temperature 18 á 20° C., op-

tinum temp. at 33° C, maximum temp. (for growth) 40° a 41° C. Already 48° C is mortal to the fungus, provided the duration of the exposition is made long enough.

Growth of the fungus can take place only on practically saturated tobacco leaves.

The humidity and temperature relations of *Andreaea deliensis* determine the peculiar localization of the damage in the fermentation stack to a region, ranging from the centrum of the stack to about 2 feet within its surface.

Precautionary measures must above all concentrate on stacking the tobacco only when not too moist; overmore, at all manipulations excessive moisture has to be avoided. Has an infection already taken place, the stack has to be pulled down and rearranged. For export, the tobacco must be kept air dry; if the tobacco arrives in Europe free from any traces of the fungus, the low temperature will prevent new development.

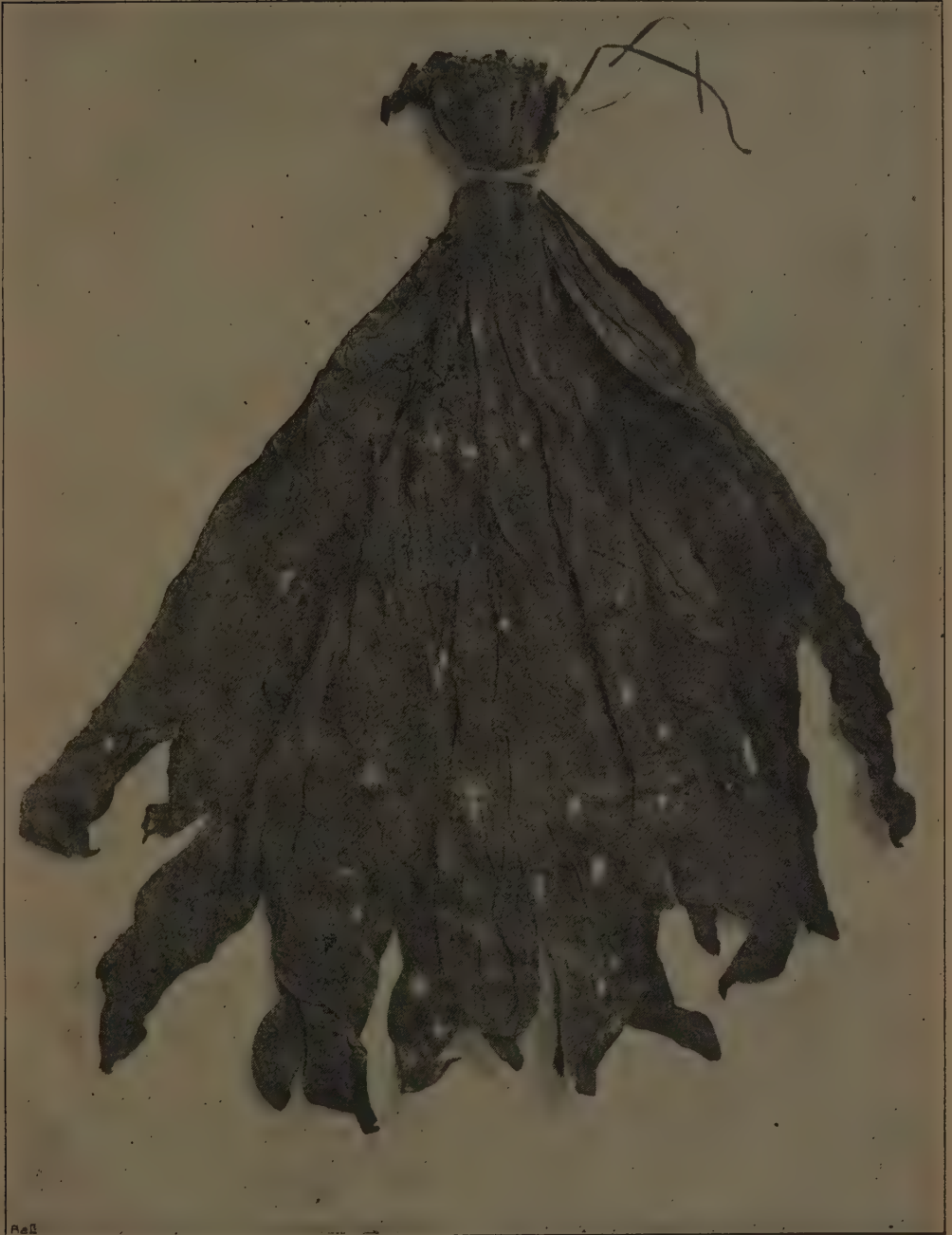
VERKLARING DER PLATEN.

- Plaat I. Gefermenteerde tabaksbundel (voetblad) met witte vlekken, door *Andreaea deliensis* veroorzaakt.
- Plaat II. Reincultures van *Andreaea deliensis* van verschillende leeftijd op bouillon-pepton-agar. (Men lette op het donkerder worden van de kolonies bij toenemenden ouderdom).
- Plaat III. Fig. 1. Myceel met „conidiën-dragers” en conidiën-ketenen van *Andreaea deliensis* ($\times 250$). — Fig. 2. Sclerotia van verschillende leeftijd ($\times 50$).
-

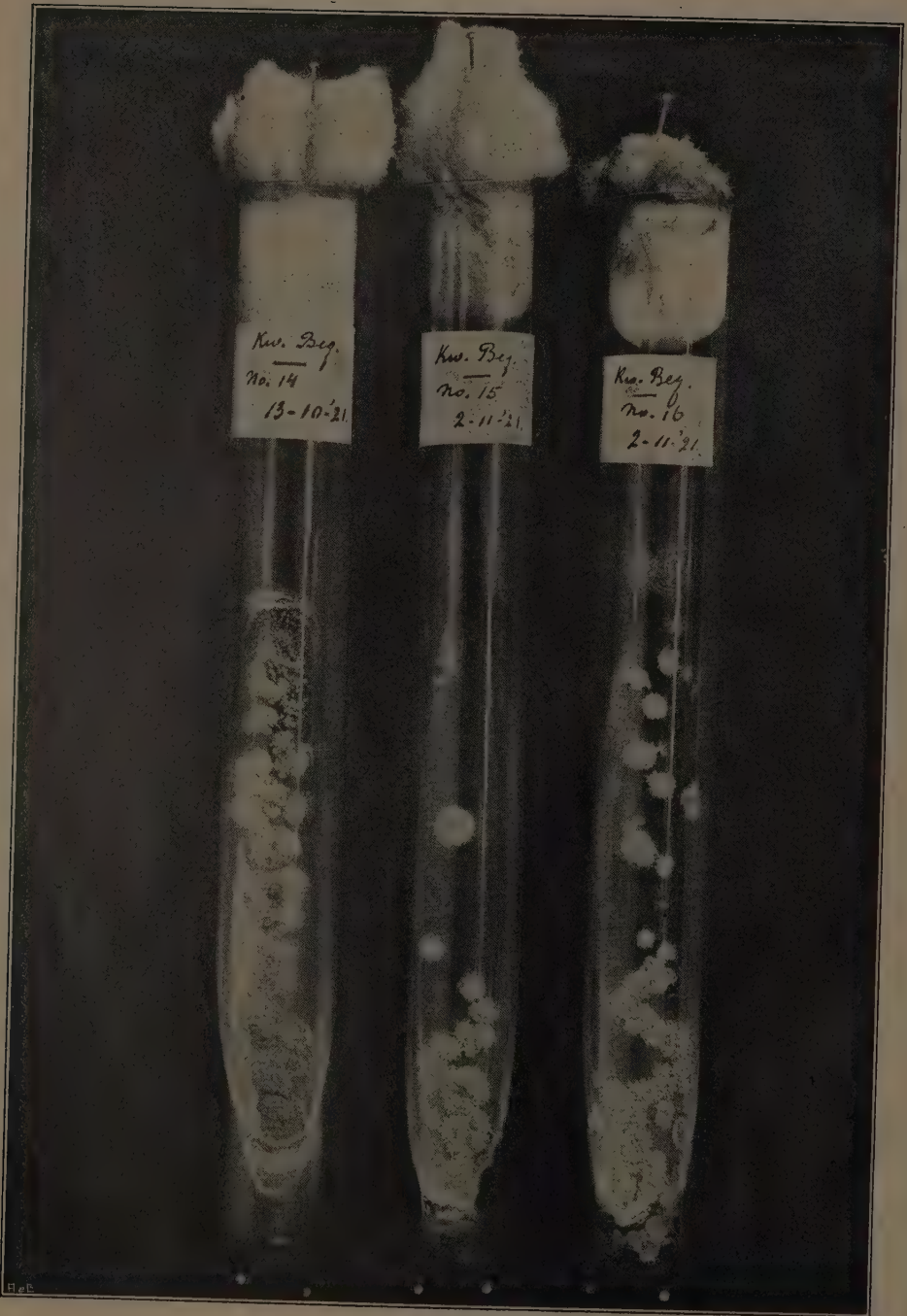
EXPLANATION OF THE PLATES.

- Plate I. Fermented tobacco leaves (foot leaves) with white spotting, caused by *Andreaea deliensis*.
- Plate II. *Andreaea deliensis* on bouillon pepton agar, showing the consecutive changes in colour of the colonies.
- Plate III. *Andreaea deliensis*. — Fig. 1. Mycelium and formation of conidia ($\times 250$). — Fig. 2. Sclerotia of different age ($\times 50$).
-

PLAAT I.



PLAAT II.



PLAAT III.

